

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公表

## ⑫ 公表特許公報(A)

昭63-502117

⑬ 公表 昭和63年(1988)8月18日

⑭ Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門(区分) 3(2)
A 61 K 9/10	3 2 7	A-6742-4C			
// A 61 K 37/24		M-6742-4C			
B 01 J 13/02		8615-4C			
		Z-8317-4G			

(全 14 頁)

⑯ 発明の名称 放出を制御されたリボソーム供給系

⑰ 特 願 昭62-501773

⑱ 翻訳文提出日 昭62(1987)10月12日

⑲ 出 願 昭62(1987)2月9日

⑳ 国際出願 PCT/US87/00285

㉑ 国際公開番号 WO87/04592

㉒ 国際公開日 昭62(1987)8月13日

優先権主張 ㉓ 1986年2月10日 ㉔ 米国(US) ㉕ 828153

⑳ 発 明 者	ロウーヤン, アニー	アメリカ合衆国 カリフォルニア ロス アルトス, アネット レー 1983
㉑ 出 願 人	リボソーム テクノロジー, インコーポレイテッド	アメリカ合衆国 カリフォルニア 94025 メンロ パーク, ハミルトン コート 1050
㉒ 代 理 人	弁理士 山本 秀策	
㉓ 指 定 国	AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)	

## 請求の範囲

1. リボソーム不透過性化合物を捕捉した形で含むリボソームの懸濁液を形成し、該懸濁液を筋肉内部位または皮下部位に注射することによって該化合物を投与する際に、該注射部位から血流への該化合物の放出割合を選択的に増加させる方法であって、

該部位に注射されたリボソームの平均サイズを選択的に増加させること、および

該部位に注射されたリボソーム懸濁液の量を選択的に増加させること、

を包含する方法。

2. 前記化合物がカルシトニン、成長ホルモン、インシュリン、インターフェロン、およびインターロイキン-2である群から選択されたペプチドである、請求の範囲第1項に記載の方法。

3. ホルモンがカルシトニンであり、該ホルモンが懸濁液のリボソーム中に少なくとも約0.10~1.0mg/mlの濃度で被包されている、請求の範囲第2項に記載の方法。

4. 前記リボソームに対して、負に荷電したリン脂質の量を減少させて、前記注射部位からの前記化合物の放出割合を増加させることを、さらに包含する、請求の範囲第1項に記載の方法。

5. 前記捕捉された化合物を含む前記リボソームの平均サ

イズが約0.2ミクロンより小さく、そして平均サイズが約0.5ミクロンより大きな空のリボソームの添加量を増加させることによって、前記注射されたリボソームの平均サイズが選択的に増加される、請求の範囲第1項に記載の方法。

6. リボソーム不透過性化合物を筋肉内注射部位または皮下注射部位から血流へ投与する際に用いるリボソーム組成物であって、

該化合物を捕捉した形で含む、平均粒子サイズが約0.3ミクロンより小さなリボソームの水性懸濁液、および

このような注射部位からの該化合物のクリアランス半減期を、所望の半減期である約1~14日にまで延長するのに有効な量で該懸濁液中に含まれる、ある量の空のリボソーム、

を含有する組成物。

7. 前記空のリボソームの平均粒子サイズが約0.5ミクロンより大きい、請求の範囲第6項に記載の組成物。

8. 前記化合物がカルシトニン、インシュリン、成長ホルモン、インターフェロン、およびインターロイキン-2である群から選択されたペプチドである、請求の範囲第6項に記載の組成物。

9. ホルモンがカルシトニンであり、前記リボソームの被包空間内のホルモン濃度が少なくとも約1mg/mlである、請求の範囲第8項に記載の組成物。

10. 前記リボソームがオートコファロールを少なくとも約0.2モル%の量で含む、請求の範囲第6項に記載の組成物。

11. リボソームカルシトニン組成物であって、  
少なくとも約 0.2モル%のα-トコフェロールを含むリボソーム 無菌水性懸濁液、および

該リボソームに捕捉され、該リボソームの被包空間内の濃度が少なくとも約1mg/mlであるカルシトニン、  
を含有する組成物。

12. 前記リボソームが約5〜100モル%の間のホスファチジルグルセロールを含む、請求の範囲第11項に記載の組成物。

13. 前記リボソームの平均サイズが少なくとも約0.3ミクロンであり、そして前記組成物を筋肉内部位または皮下部位に注射した場合に、血流へのカルシトニン放出の半減期を増加させるのに有効な量で、さらに空のリボソームを含む、請求の範囲第11項に記載の組成物。

14. 前記空のリボソームの平均サイズが少なくとも約0.5ミクロンである、請求の範囲第13項に記載の組成物。

口投与される化合物について、リボソームは、長期間にわたって制御された「封入物」の放出を供給し、そして血液中の薬物化合物の血漿ピークレベルを制限することにより毒性のある副作用を抑える力を有する。これらの兼ね備えられた長所は、化合物をより少ない回数の投与およびより高い投与量レベルで投与することを可能としており、それによって治療の便利さが増す。

経口投与のために広く提案されているリボソーム投与の経路の1つに、静脈内(IV)注射がある。この経路によって投与されるリボソームは、一般に細胞内皮系(RES)により除去され(cleared)。その結果、リボソームは RES細胞に富む肝臓、脾臓および肺のような器官に集中する傾向がある。リボソームを RESに富む組織にある薬物特異的にみちびく能力は、例えば、肝臓、脾臓または肺の病気の治療に対して有利である。この方法は、例えば、米国特許出願「リボソーム/アントラキノン薬剤の組成物および方法」(1985年12月5日出願の特許出願第808084号)に記載されている。この特許出願には、リボソームに捕捉されたドキソルビシンによる肝臓癌の治療のための改良された治療法を開示している。しかし、投与すべき化合物を RESに富む組織以外の部位に用いようとする場合、特にもし血流への長期間の放出が必要とされるときには、IV投与はしばしば使用が限定される。

リボソームに捕捉された化合物の筋肉内(IM)または皮下(SB)投与もまた、提案されている。この方法は、リボソ-

### 放出を制御されたリボソーム供給系

#### 1. 発明の分野

本発明は、リボソームを基本とする系および制御された速度で血流へ薬物学的に活性な化合物を供給するため 方法に関する。

#### 2. 参照文献

1. Abra, R.H., 他, Res Connect Chem Path and Phare, 37:199 (1982).
2. Fukunaga, N., 他, Endocrinology, 115(2):757 (1985).
3. Greenwood, P.C., 他, Biochem J, 89:114 (1963).
4. Jackson, A.J., Drug Metab and Dispos, 9(6):535 (1981).
5. McParlane, A.S., Nature, 182:53 (1958).
6. Sacka, F., Jr, Proc Nat Acad Sci, USA, 75:4194 (1978).
7. Sacka, F., Jr, Ann Rev Biophys Bioeng, 9:467 (1980).

#### 3. 発明の背景

リボソーム供給系が、薬剤やペプチドホルモンのような、種々の薬物学的に活性な化合物について提案されている。非特

ムが注射部位に存在する限り、RES による迅速な取り込みと除去(クリアランス: clearance)はおこらないという利点を有する。注射部位に固定されたリボソームは、その後捕捉された化合物を長期間にわたって血流へ放出することができる。その例として、英国特許出願第 2,050,287号には、SB注射部位からインシュリンをゆっくりと放出するために意図されたリボソーム系が開示されている。ごく最近、IM投与部位からのリボソームに被包されたカルシトニン放出のための系が提案されている(Fukunaga)。

前述のタイプのIMまたはSB放出系においては、注射部位からのリボソームに捕捉された化合物の放出速度を制御できることが望ましいであろう。しかし、注射部位からの薬剤放出速度に影響する変数を理解し、制御しようとする従来技術の試みは、限られた成果しかあげていない。これらの研究の質の低さの原因の1つは、捕捉された化合物のリボソームからの放出に影響する因子から、注射部位におけるリボソームの分解速度および/または放出速度に影響する因子を分離するという問題である。例えば、もし、リボソーム透過性薬剤が研究されるならば、血流中への薬剤放出速度と、注射部位でのリボソームの安定性とはほとんど独立した関係であり得る。

今日までに報告されているひとつの研究においては、IM注射部位からのリボソームに捕捉されたインシュリンの放出における、いくつかのリボソームの変数の効果が調べられている(Jackson)。その結果の概略は次のとおりである:(a)より

小さいリボソーム (0.15 ~ 0.7 ミクロン) は、より大きいリボソーム (0.3 ~ 2.0 ミクロン) よりも、リンパ液によってより迅速に取り込まれる；そして注射されたリボソームの設置が減少するにつれ、注射部位から リボソームの吸収はより速くなる。これらの結果 どちらも、次の事項を予測していない。つまり注射部位へ投与されたリボソームから、リボソーム非透過性の物質 (例えばペプチド) が放出される速度をどのようにして制御するのか、ということも予測していない。さらに、ヒトの治療に使用するために、どのくらい大きなリボソームが凝固された形で調製され得るのか、ということも明らかではない。

#### 4. 発明の要約

それゆえ、注射部位からのリボソーム非透過性化合物の放出速度を、選択された方法で制御するための系と方法とを提供することが、本発明の一般的な目的である。

本発明の他の目的は、ヒトに注射または投与するのに適した無菌的な形で容易に調製し得る、そのような系を提供することである。

本発明のさらに他の目的は、制御された放出速度での非経口的なホルモンの供給に用いられる、安定なリボソーム/ペプチドホルモン組成物を提供することである。

本発明は、血液へのリボソーム非透過性化合物の放出速度を選択的に増加させる方法を含む。その化合物は、該化合物

を捕捉する形態で含有するリボソーム懸濁液を形成し、注射または投与部位へこの懸濁液を注射することにより投与される。注射部位からの物質の放出速度は、該部位に注射されたリボソームの平均サイズやリボソーム懸濁液の総注射量を増加することにより、選択的に増加する。カプセル化された物質は、インシュリン、成長ホルモン、カルシトニン、インターフェロン、インターロイキン-2 などのペプチドでありうる。このペプチドは、制御された速度で数日間にもわたり血液中へ有利に放出される。

リボソームに被包された物質の放出速度もまた、リボソームの脂質組成を変えることにより制御され得る。ホスファチジルグリセロール (PG) のような、負に荷電したリン脂質は、放出速度を減少するように作用し、コレステロールは速度を増加するように作用する。

ひとつの実施態様においては、リボソームは次の方法により調製される：まず、化合物をカプセル化した小さなリボソームの懸濁液を調製し、該懸濁液の中からカプセル化されていない化合物を除去し、その懸濁液を濾過滅菌し、そして、所望のリボソームの平均サイズおよび濃度になるまで、この懸濁液に無菌的に調製した空のリボソームを加える。小さなリボソームは約 0.3 ミクロンを下まわるサイズが好適であり、空のリボソームは 0.5 ミクロンかそれ以上が好適である。

本発明はまた、注射または注射部位からの血液へのリボソーム非透過性化合物の投与のためのリボソーム組成物を包含

する。この組成物は、物質を捕捉した形態で含有し、粒子のサイズの平均が約 0.3 ミクロンを下まわるリボソーム、およびこのような注射部位からの物質の除去の半減期を約 1 ~ 14 日の間の所望の半減期へと増加させるのに有効な量の空のリボソームを有する、リボソームの懸濁液を含む。空のリボソームのサイズ、脂質組成、および相対量は、注射部位からカプセル化した物質が所望の放出速度で供給されるように選択される。

さらに他の面では、本発明はリボソーム/カルシトニン (CT) 組成物を含む。この組成物は、少なくとも約 0.2 モルパーセントのオートコフェロールを含有する被包されたリボソーム懸濁液、およびリボソームの被包空間に少なくとも 0.1 ~ 1 mg/μl の濃度でリボソームに捕捉された CT を含む。その組成物は、懸濁液中に存在する第二鉄の量よりも過剰のモル量でフェリオキサミンが存在することによりさらに安定化しうる。

本発明のこれらおよびその他の目的と特徴は、次の本発明の詳細な記述を添付した図とともに読むと、より十分あきらかになるであろう。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、空の脂質およびペプチドを被包する脂質の両方を含むリボソーム組成物の調製に用いられる、加工方法の流れ図である；

第2図は、注射部位からのリボソームのトレーサー脂質の放出のカイネティクス (Kinetics) (丸印)、および注射された動物から分泌されるトレーサーの蓄積 (三角印) を示す；

第3図は、第2図のトレーサー放出データ (破線)、および小さいサイズのリボソームを有するリボソーム組成物からの類似のトレーサー放出データ (実線) の片対数プロットである；

第4図は、注射部位からのカプセル化された放射活性カルシトニン (CT) の放出のカイネティクス (丸印)、動物から分泌されるホルモンの蓄積 (三角印)、および注射部位からの遊離 CT の放出 (四角印) を示す；そして、

第5図は、第4図からの CT 放出データの片対数プロットである。

#### 発明の詳細な説明

##### 1. リボソーム組成物の調製

##### A. 脂質成分

組成物中のリボソームは、極性的な小胞形成性脂質から形成される。その脂質は、通常、中性および負に荷電したリン脂質、およびコレステロールのようなステロールを含む。脂質の選択には、通常、次の事項が考慮される：(a) 所望のリボ

ソームサイズおよびリボソームのサイズ調整の容易さ、およびリボソーム注射部分からの脂質およびホルモンの放出速度。

典型的には、リボソーム中 主要な脂質成分はホスファチジルコリン(PC)である。種々の長さおよび飽和度を有する種々のアシル鎖を持つPCが入手可能で、もしくは既知 方法により単離または合成され得る。一般には、ほとんど飽和していないPCがより容易にサイズ調整される。特に透過膜用の用途のため、リボソームが約0.3ミクロンを下まわるサイズに調整されなければならないときにはそうである。サイズ調整に用いられる方法および透過膜用リボソームは以下に述べられる。アシル鎖の飽和効果は、リボソームが膜内に投与される場合よりは、薬剤放出速度に影響を与えないようであるが、リン脂質のアシル鎖組成はまた、リボソーム脂質および捕捉された化合物の注射部位からの除去速度に影響を与え得る。1つの好ましいPCは、卵の脂質に由来する卵 PC(EPG)であり、これは、飽和および不飽和のアシル鎖の混合物を含む。

本発明に基いて行い、以下の実施例ⅢおよびⅤで報告されている実験は、次の事例を示す。つまり、負に荷電したリン脂質は、PC単独もしくはPC/コレステロール混合物から生成したリボソームと比べると、脂質および捕捉されている化合物の注射部位からの除去速度を有意に増加させるということを示す。この研究では、選択されたモル比のPGを用い

て生成するリボソームを含むが、ホスファチジルセリン(PS)およびホスファチジルイノシトール(PI)のような負に荷電した他のリン脂質も使用することが可能であった。観察されるPGの効果は、部分的には、自然に起こるリボソームの融合を阻止する荷電性 脂質の能力に関係するようである。実施例Ⅳに報 述するように、1ミクロン孔径のポリカーボネート膜を通して押出すことによりサイズ調整した後にリボソームのサイズを測定すると、PGを含むリボソームが約1ミクロンという安定なサイズを有する。これに対して、PCのみを含むリボソームは、約3〜5ミクロンの間の粒子サイズを有することが示される。以下に見られるように、そして本発明方法の1つの重要な実施態様によれば、より大きなリボソームサイズが、注射部位においてより長い薬剤の放出を示す。

実施例ⅣおよびⅤで示される事実は、負に荷電したリン脂質もまた、リボソームのサイズに関係しない機構により、そのまま脂質および薬剤の放出を増加させ得ることを示す。簡単に述べれば、純粋なPG(プラス少量のα-トコフェロール)を含むリボソームについては、PGを5または10モルパーセントの割合のみで含む同様のサイズのリボソームよりも、脂質トレーサーおよび放射標識されたカプセル化ベアチドが、速く除去されることが示された。種々のアシル鎖成分を有し、負に荷電したリン脂質が入手され得る。1つの好ましい脂質は卵PG(EPG)であり、これは飽和および不飽和のアシル鎖部分の混合物を含む。

添加されたコレステロールの、薬剤と脂質との放出(注射部位からの)におよぼす影響もまた調べられた。一般に、コレステロールはリボソームの安定性を増加させることが知られており、そのため、注射部位からの脂質および捕捉された成分の除去に要する時間を増加させることが期待され得る。実施例Ⅴで報告されるように、約6:4のモル比でPCおよびコレステロールを含むリボソームは、純粋なPCリボソームよりも、被包されたベアチドの放出時間が約20%長くなることが示された。しかし、PGを含むリボソームにコレステロールを加えても、脂質またはカプセル化されたベアチドの注射部位からの放出速度には、ほとんど変化がなかった。

#### B. 保護剤

リボソームの脂質成分は、過酸化および遊離ラジカル反応を促進することが知られている。これらの反応はリボソームの分解を促進する。この問題は、「アントラキノン/リボソーム組成物および方法」という上記の特許出願において充分に述べられている。簡単に述べれば、その出願には、脂質の過酸化反応および遊離ラジカルによる損傷によりリボソーム/薬剤組成物中の脂質および捕捉されている薬剤成分の両方が劣化すると報告されている。脂質および薬剤成分に対する遊離ラジカルによる損傷の程度は、α-トコフェロール(α-T)のような親脂性の遊離ラジカル消去剤が小胞を形成している脂質中に含まれていると、有意に減少した。興味あるこ

とに、脂質損傷および薬剤修飾における有意の減少が、次の場合に観察された。つまり、脂質/薬剤組成物が、α-T、およびフェリオキサチミンのような水溶性の鉄特異的キレート剤の両方の存在下において処方された場合に、観察された。フェリオキサチミンは6配位で鉄イオンに強固にキレート結合し得るので、その化合物は、リボソーム懸濁液の水相で、鉄触媒による過酸化を阻止するように作用し得る。2つの保護剤の効果は共に、次の事例を示唆する。つまり、水相で起こる鉄触媒による過酸化反応、および遊離ラジカル反応(脂質格で増強される)の両者が、脂質の過酸化反応の損傷に対して重大に寄与する、ということを示唆する。

この組成物に用いられる親脂性の遊離ラジカル消去剤は、好ましくはα-T、もしくは薬学的に許容され得る類似物またはそれらのエステル(例えば、コハク酸α-トコフェロール)である。その他の遊離ラジカル消去剤には、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、没食子酸プロピル(Aegustin)、およびそれらの薬学的に許容され得る塩および類似物が包含される。リボソーム中で、効果的なレベルで、ヒトに経口投与し得る付加的な親脂性の遊離ラジカル消去剤がまた、リボソーム内の効果的なレベルで使用され得る。この遊離ラジカル消去剤は、典型的には、従来の手法によりリボソームを調製するのに用いられている脂質成分に含まれる。保護化合物の好ましい濃度は、リボソームを構成する全脂質成分の約0.2から2モルパーセントの間である。しかし、より高濃

度の化合物(特に $\alpha$ -Tまたはそのコハク酸エステル類似物)が、リボソームの安定性に適合し、薬学系に受容される。

水溶性の鉄 異的キレート剤は、天然および合成のトリヒドロキサミン酸のクラスより選択される。このキレート剤は、第2鉄イオンに対する非常に高い結合定数( $10^{12}$ のオーダー)で、そして、2価の陽イオン(例えば、カルシウムおよびマグネシウム陽イオン)に対して比較的低い結合定数を有することによって特徴づけられる。種々の天然起源のトリヒドロキサミン酸が知られている。それらには、フェリクロム、フェリクロムA、およびアルボマイシンのようなフェリクロムクラスの中の化合物;フェリオキサミンおよびフェリオキミンを含むフェリオキサミンクラスの化合物;そしてフアルアミンのクラスの化合物が含まれる。

1つの望ましいキレート剤はフェリオキサミンBであり、このフェリオキサミンBは、また、フェリオキサミン、デスフェリオキサミン、デスフェリオキサミンBおよびDesferal<sup>TM</sup>として知られている。この化合物は例外的な鉄結合親和性を示し、鉄貯蔵疾患や鉄中毒の治療でヒトに対して経口の用途では安全であることが実証されている。

上記キレート剤は、リボソーム懸濁液中に第2鉄が過剰である濃度で、組成物中に存在する。典型的には、リボソームの調製に用いられる水性の媒体は少なくとも約1~2  $\mu$ Mの第2鉄を含み、そして、100  $\mu$ Mまたはそれ以上の第2鉄を含有し得る。約20  $\mu$ Mまでの鉄を含む水性の媒体には、約

50  $\mu$ Mのキレート剤の濃度が好ましい。

キレート剤は、好ましくは、リボソーム形成時に小胞を形成する脂質に加えられ、それにより、リボソーム調製中に、薬剤により促進される脂質の酸化的損傷から脂質が保護される。キレート剤の水溶性性を加えることによるリボソームの調製方法は以下に記載される。ここでは、次の事項がわかる。つまり、この方法で形成されたリボソーム懸濁液のみが、キレート剤を、大部分を占める水相に、そして、カプセル化された形(つまり水性のリボソーム内部領域)の両方に含む、ということがわかる。あるいは、キレート剤は、リボソームの形成後、懸濁液中に含有され得る。

### C. 増進された化合物

リボソームに増進された化合物は、リボソーム不透透性の薬剤またはペプチドである。そのリボソーム外への拡散速度は、1H注射部位でのリボソームの通過速度よりも実質的に高くない。その試薬は、親油性薬剤またはホルモン、または水溶性の薬剤またはペプチドであり得る。上記親油性の薬剤またはホルモンは、その油/水の分配が著しくリボソームの2重層の相方に傾いており、上記水溶性の薬剤またはペプチドは、リボソーム2重層を通過して(拡散することがあったとしても)、ゆっくりと拡散させることが可能である。リボソーム外へ自由に拡散でき、半減期が数時間を下まわる水溶性の薬剤は、本発明からは特に除外する。

ペプチドホルモンおよび免疫的活性化剤は、本発明で用いる化合物の1つの重要なクラスである。代表的なペプチドホルモンには、インシュリン、成長ホルモン、およびカルシトニン(CT)が含まれ、これらは、カルシウムの血中レベルを制御する。インターフェロンおよびインターロイキン2は免疫的活性化剤の代表である。本発明によれば、選択されたペプチド化合物をゆっくりとした制御された速度で数時間から数日間にわたり血流中へと放出することが可能となる。そのため、速効ホルモンの投与に特徴的である血中ペプチドレベルの大きな変動が回避される。

さらに、そして本発明における1つの発見によれば、ペプチドが比較的低濃度で存在している場合には、キャリアリボソームは、貯蔵にあたって該ペプチドの安定性を有意に増強し得る。実施例IIに報告する実験は、遊離型のCTの安定性が、CT濃度が0.010  $\mu$ g/ $\mu$ lから1.0  $\mu$ g/ $\mu$ lに上昇すると、数倍増強されたことを示す。リボソームに比較的高い濃度(例えば1  $\mu$ g/ $\mu$ l)でカプセル化されており、しかし大部分を占める相の濃度が比較的低い(例えば、0.010  $\mu$ g/ $\mu$ l)状態で存在するCTは、高濃度の遊離のホルモンで見られるのと同様の安定効果を示す。従って、本発明によれば、高濃度でより安定であるCTのようなペプチドホルモンが、比較的希釈された形で貯蔵されそして送達される。その状態においては、該ホルモンの高濃度の微量環境により、貯蔵に際して良好な安定性が付与される。CTのような水溶性のペプチドを、選択された

内部容積濃度でカプセル化するリボソームの調製が次に検討されている。

ステロイドホルモンおよび抗炎症剤は、本発明で有用な他の重要なクラスである。代表的なステロイドには、ヒドロコルチゾン、エストラジオール、およびテストステロンが含まれる。増進されたステロイドを含むリボソームは、該化合物を小胞を形成する脂質中に包含させることによって容易に処方される。ステロイドの1Hまたは5H注射部位からの放出速度は、薬剤の分配係数、および注射部位でのリボソームの安定性および注射部位からの移動により制御される。

1Hまたは5H部位からのゆっくりとした放出リボソームの運搬に運した他のタイプの化合物には、アンネテラシンBのような抗生物質、シクロスポリンのような免疫抑制剤、およびドキソビシンのような抗腫瘍剤が含まれる。1985年9月27日に出版された共同出願の特許出願第781,395号「アンネテラシンB/リボソーム組成物」には、安定なリボソームサイズに適合する形の(総脂質の20モルパーセントまでの)高いモル比のアンネテラシンBを含む新規リボソーム組成物が開示されている。抗生物質または抗腫瘍剤の送達について特に有利な本発明の1つの特徴は、薬剤放出部位および最も高い薬剤濃度を選択する能力である。

(以下余白)

## D. リボソームの調製

リボソームの調製には、多様な方法を用い得る。これらの方法に関しては、Szoka(1980)によって詳細な説が、かれている。ある好ましい方法では、不均一なサイズの多重ラメラ小胞(HLV)が調製される。この方法においては、脂質膜和性の遊離基(遊離ラジカル)保護剤を含む小胞形成脂質、およびもし適当なら、脂質膜和性の薬剤混合物を、適当な有機溶媒または溶媒系に溶解し、真空または不活性気体下で乾燥させて脂質薄膜を形成させる。必要に応じて、この膜は第三ブタノールのような適当な溶媒に再び溶解し、次いで凍結乾燥させて、より容易に水和される粉末状のより均一な脂質混合物を形成させ得る。この膜は、水和媒体で覆って、攪拌することにより典型的には15~60分間かけて水和させる。得られるHLVのサイズ分布は、より激しい攪拌条件下で脂質を水和させることによって、より小さなサイズに変化させ得る。

ペプチドホルモンのような被包水溶性化合物を有するリボソームを形成させる場合、この化合物は最終的なリボソーム懸濁液中のリボソームの内部容積における所望の濃度で水和媒体に溶解させる。従って、例えば約1mg/mlの内部空間濃度でCTが被包されているリボソームを形成させるためには、水和媒体は1mg/mlのCTを含有する。この水和媒体は、約10~50mMの間の好ましい濃度で独特のキレート剤を含有するようにも調製し得る。実施例Iには、CTが被包されているHLVの懸濁液の製造方法を記述する。

リボソームの調製に対して優れた方法であって感熱性の被包材料を含むリボソームを調製するために用い得る唯一の方法は、通常の深さのフィルター、典型的には0.22ミクロンのフィルターを用いた濾過によるものである。この方法は、最初にリボソームのサイズを約0.2~0.3ミクロンまたはそれ以下に小さく調整している場合のみ、処理量が高く真確的な基準に基づいて実施し得る。

リボソームをこのサイズの範囲にまで小さくするのに有用な技術にはいくつかある。リボソーム懸濁液を浴中の音波処理またはプローブを用いた音波処理のいずれかで音波処理すると、サイズが約0.05ミクロンより小さな小単ラメラ小胞(SUV)への顕著なサイズ減少が生じる。均質化は、別の方法であって、剪断エネルギーによって大きなリボソームをより小さなものに断片化する。典型的な均質化法においては、HLVを標準的な乳剤ホモナイザーに通し、選別されたリボソームサイズ、典型的には約0.1と0.5ミクロンの間のサイズが観察されるまで再循環する。同様の方法において、粒子サイズの分布は、通常のレーザードープによる粒子サイズ検出法でモニターし得る。

リボソームを小孔ポリカーボネート膜に通して押し出すことは、リボソームサイズを比較的良く限定されたサイズ分布へと減少させる効果的な方法である(Szoka 1978)。典型的には、所望のリボソームサイズ分布が達成されるまで、懸濁液を数回膜に通して循環させる。リボソームを連続的に、よ

う一つの有利なリボソーム製造方法は、Szoka(1978)によって記述されている逆相蒸発法である。ここでは、有機溶媒または溶媒系中、小胞形成脂質の溶液を、油中水型乳剤と適合するような相対的容量で、被包されるべき材料の水溶液に添加する。次いで、この混合物を乳化し、有機相を除去することにより、水相が被包されている脂質単層構造より成る逆相脂質ゲルを調製する。このゲルは、水溶液に再懸濁させると、一般に逆蒸発小胞(RBV)と呼ばれている比較的大きなオリゴラメラ小胞の懸濁液を形成する。この方法は、高い被包効率、典型的には添加された全水溶性材料の約30~40%の効率を与える。従って、高価な薬剤、またはペプチドホルモンのようなペプチド化合物の被包に有用である。

使用する方法に関係なく、リボソーム調製は、好ましくは無菌リボソーム懸濁液になるような条件下で実施される。これは、この方法の間に従来の滅菌技術を用いることによって行われる。

## B. リボソームのサイズ調整

最初のリボソーム調製が無菌条件下で行い得るとしても、一般的には遊離の薬剤を除去するために調製物を処理することが必要であり、このような処理は、一般に無菌的に実施することが困難な方法を包含している。従って、これらのリボソームが経口注射に使用し得るようになる前に、最終的な滅菌が要求される。

り小さな孔の膜に通して押し出し、リボソームサイズを徐々に減少させ得る。

## F. 遊離の薬剤の除去

上述したRBV法のような最も効率の良い被包化法でさえ、水溶性化合物の最大被包化効率は約50%である。従って、初期段階のリボソーム懸濁液は、50%またはそれ以上の該化合物を遊離した(被包されていない)形で含む。被包化効率が約10~20%の間であるのが典型的な、上述のHLV法によって形成されたリボソーム懸濁液は、被包されていない材料の量がさらに多い。実施例Vで報告されている研究は、遊離の(被包されていない)ペプチドが、リボソームに被包された化合物については数時間から数日間であるのに比較して、1時間より早くIH注射部位から取り除かれることを示している。従って、注射部位からの急速な薬剤放出の効果を最少にするためには、注射された組成物中に存在し得る遊離の薬剤を除去することが重要である。

リボソーム懸濁液から被包されていない化合物を除去するのに有用な方法はいくつかある。ある簡単な方法では、懸濁液中のリボソームを高速度心分離によってペレット化し、遊離の化合物および非常に小さなリボソームを上清中に残す。別の方法では、限外濾過により懸濁液を濃縮し、濃縮されたリボソームを、薬剤を含まない代わりの媒体中に再懸濁することを包含する。あるいは、より大きなリボソーム粒子を母

質分子から分離するためにゲル濾過を用い得る。

遊離の化合物を除去するさらに別の方法では、イオン交換分子ふるい、またはアフィニティークロマトグラフィーを利用する。ここでは、遊離した形の化合物とは結合するが、捕捉された形の化合物とは結合しない樹脂、あるいは被包されていない化合物に特異的に結合する、例えば抗生物質のような結合分子を付着させた担体を含むカラムにリボソーム懸濁液を通す。この方法は、樹脂を速やかに選択することにより、遊離の発熱因子を除去する際にも効果的であり得る。

遊離の薬剤を除去するための処理に続いて、リボソーム懸濁液を18投与または50投与で用いるのに望ましい濃度にする。これは、リボソームが、例えば遠心分離または限外濾過によって濃縮されている場合には、このリボソームを適当な量の注射器体に戻懸濁すること、あるいは薬剤除去工程が懸濁液の全容量を増加させる場合には、この懸濁液を濃縮することを含む得る。次いで、この懸濁液は、上述のように濾過によって滅菌する。

### C. リボソームの加工

第1図は、本発明のリボソーム組成物を調製するのに適したリボソーム加工の作業工程図である。図中の左側の作業工程は、捕捉された化合物を有するリボソームの無菌懸濁液を形成させる工程を示している。上で詳述した、これらの工程は、選択された捕捉濃度の化合物を含むリボソーム懸濁液を

まず調製することを包含する。次いで、最後 滅菌濾過を考慮して、この懸濁液は 0.2~0.3 またはそれ以下にサイズを縮小する。捕捉されていない薬剤を除去した後、この材料を所望の貯蔵濃度にし、濾過により滅菌する。

第1図の右側の列は、空のリボソームを調製する際に用いる平行した工程を示している。空 リボソームを調製する原理は、リボソームに被包された材料の、18または50注射部位からの放出割合が、(a)貯蔵組成、(b)平均リボソームサイズ、または(c)注射されたリボソームの全脂質量を変更することによって選択的に変化させ得るという発見に基づいている。これらのパラメーターと化合物放出割合の間の関係は、以下の第2図および実施例Ⅱ~Ⅵで詳述される。ここでは、上記部位に注射されたリボソームの大部分が、捕捉された化合物を含んでない場合でさえ、これらの効果が達成されるということに注目すれば十分である。すなわち、化合物放出割合に対する貯蔵の組成、サイズ、および量の効果は、空のリボソームおよび化合物含有リボソームに同じように影響を与えるリボソーム/リボソーム相互作用に依存するようである。

貯蔵の組成、サイズ、および量を変化させる方法としての空のリボソームの利点は、それらが最終的な滅菌濾過工程を必要とせずに無菌の形で調製し得ることである。主として、遊離の化合物を懸濁液から除去することが必要なために、リボソーム調製物の無菌性が損なわれることが思い出される。化合物が存在しないが、あるいは相当量の遊離した化合物を

生じさせないような量の化合物の存在下でリボソームを形成させることにより、最後の滅菌濾過工程を回避し得る。空のリボソームは、濾過のためにサイズを小さくしなくてよいので比較的大きなリボソームを添加することにより、化合物放出割合において、より大きなサイズに関連した効果を達成し得るのが重要な利点である。

第1図の右側に示した工程を考慮すると、空のリボソームを、必要に応じて処理し、より小さなリボソームを除去し得る。これは、例えば、容器中により大きなリボソームを固定し、固定されなかった材料を無菌的に除去することにより行い得る。あるいは、これらのリボソームは、さらに処理することなく、フィルター滅菌したリボソームに直接添加することにより、選択された平均貯蔵組成、サイズ、および濃度を有する最終組成物を調製し得るか、またはこれらのリボソームは、フィルター滅菌したリボソームに添加する前に、無菌条件下で、1ミクロンのポリカーボネート膜に通して押し出すことによって、そのサイズを調整し得る。

従って、上述の加工法は、(a)選択された捕捉化合物濃度を有し、(b)遊離の化合物をほとんど含まないか、または全く含まない、そして(c)選択された放出割合で、注射部位から、捕捉された化合物を放出させる平均のリボソームサイズ、濃度および組成を有する無菌リボソーム組成物の調製を可能にする。

## 2. 組成物の特性

### A. 安定性

本発明のある有利な特徴は、リボソームに被包されることによってペプチドホルモンのような薬理学的化合物の安定性が増大することにある。特に、CTに対して見い出されているように、このような化合物が濃縮された形でより安定である場合には、リボソームに被包されることによって、この化合物は懸濁液中に安定な形で保存され得る。該懸濁液中では、この化合物は局所的な高濃度を有するが、全濃度は比較的低い。例えば、実施例Ⅱに報告されている研究によると、担体タンパクの存在下でさえ、遊離のCTは0.01mg/mlより1mg/mlの方が実質的により安定である。内部容量濃度は1mg/mlであるが、懸濁液濃度は0.01mg/mlで、ペプチドがリボソーム内に被包されている場合、このペプチドは高濃度CTの安定特性を示す。

リボソームの安定性は、貯蔵pHと性的遊離基捕捉剤、例えばα-Tを少なくとも約0.3のモル比で含有させることにより向上する。さらに、組成物の安定性は、フェリオキサミンのような放熱的キレート剤を、リボソーム懸濁液中の遊離第二鉄の量より過剰のモル数で添加することにより達成され得る。CT/リボソームは、上記のように、サイズを調整され、遊離CTを除去する処理が施され、そして滅菌濾過され得る。得られた組成物は、(a)少なくとも約0.2モル%のα-Tを含

むリボソームの脂質水溶液、および同量なくとも約1mg/mlの濃度でリボソーム内に捕捉されたカルシウムを含有する。遊離のCT濃度は、被包ペプチド 約10モル%より小さいことが好ましい。

リボソームに被包されることによってCT ようなペプチドホルモンが安定な希釈された形で保存されるという発見は、様々な他のペプチドやタンパクに適用される。例えば、この方法は、酵素を安定な希釈された形で保存するのに用い得る。

### B. 脂質および被包化合物の放出特性

脂質および被包化合物のIN注射部位からのクリアランス(除去)の割合を実施例I~VIに報告されているように調べた。これらの研究の目的は2つある：(1)注射部位からの脂質クリアランスおよびペプチドクリアランスの間の関係を決定すること、および(2)ペプチド放出割合に影響を及ぼすリボソームの変数を調べることである。これらの研究は、モデルペプチド化合物としてCTを用いて行われたが、血流中に放出されるためにはリボソームの破壊が必要であるような、いかなる水溶性化合物にもこの発見を応用し得るということが認識される。

IN注射部位からのリボソーム脂質クリアランスの割合を追跡するために、トレーサー脂質として<sup>14</sup>C- 標識フェスファチジルエタノールアミン(<sup>14</sup>C-PE)を含むリボソームを実験動物の皮下に注射した。トレーサー脂質の配置は、少なくとも

(約1ミクロン)を、注射されたリボソームに添加することによって増大させ得ることを示している。後者の結果は、脂質クリアランスが平均のリボソームサイズに関連した事象効果によって支配されており、そして本発明のある局面に従い、より大きな空のリボソームを添加することによって、より小さなリボソームの放出特性を、制御する基礎を脂質クリアランスが形成していることを示している。

脂質クリアランスに対するリボソーム投与量の効果も実施例IVに報告されている。そこで考察されているように、脂質クリアランスの半減期は、脂質のサイズまたは組成には無関係に、脂質投与量が増加すると共に2倍より大きく増大し得る。投与量が増加すると共にクリアランス割合が同様に2倍に増大することは、被包CTに対して見られる(実施例V)。興味あることに、同じサイズおよび投与特性を有するリボソームからの、脂質およびCTの放出割合を比較すると(実施例V)、注射部位からのCTクリアランスは、対応する脂質トレーサーのクリアランスよりも約2倍速い。この発見は、リボソームが不安定化され、それに被包された内容物を主に注射部位で放出すること、そして該部位からの脂質クリアランスが異なった、より緩慢な機構によって取り扱われるということを示唆している。

IN部位からの脂質およびCTのクリアランスに対する脂質組成の効果も調べられた。上で考察され、実施例IVおよびVで報告されているように、魚に荷電したリン脂質、例えばPCを

も70時間の試験期間にわたって、最低8つの時点で測定された。注射部位からトレーサーの減少(丸印)および排泄されたトレーサーの量(三角印)を第2図に示す。注射部位からのトレーサークリアランスのデータは、片対数図表としてプロットした場合、第3図で示されるように直線プロットとなり、これから脂質クリアランス半減期を計算し得る。この方法の詳細は実施例IIに与えられている。

実験動物にIN注射したリボソームからの放射標識CTのクリアランスは、同様に以下のようであった。典型的な実験から得られた、注射部位からのトレーサーの減少(丸印)および排泄されたトレーサーの量(三角印)のプロットを第4図に示す。第5図に示されているCTクリアランスの片対数プロットを用いて、注射部位からのクリアランス半減期を計算した。保持されるCTの対数値と時間との間の直線関係は、脂質が注射部位から1次の速度論で除去されていくことを示している。注射部位から血流中への遊離のCTの急速なクリアランスもこの図に示されている。

脂質とCTのクリアランス割合に対するリボソームサイズの効果は、実施例IVのデータから明らかである。該データは、サイズが0.2ミクロンから約5ミクロンの範囲にわたるリボソームと、より大きなリボソーム(60~100%長い脂質クリアランス割合を示す)とを比較したものである。実施例VIのデータは、小さなリボソーム(約0.2ミクロン)からの脂質トレーサーのクリアランスが、より大きな非標識リボソーム

リボソームに添加すると、IN部位からの脂質および被包CTのクリアランス割合が著しく増大される。実施例IVで注目されるように、PC効果は、部分的には、PC含有リボソームに見られるような低減されたリボソーム濃度に関連し得る。

コレステロールは、約40%のモル比では、PC含有リボソームからの脂質クリアランスに対してほとんど効果を有さなかったが、中性のPCリボソームからのCT放出に対して著しい安定化効果一すなわち、より長いクリアランス半減期一を示した。CTは、同じサイズおよび脂質組成特性を有するリボソームから脂質トレーサーの約2倍の速さで除去されたことにより、リボソーム脂質が、被包化合物に作用する機構とは異なる、より緩慢な機構で注射部位から除去されることが確認された。

上の結果は、注射部位におけるリボソームからの被包化合物の放出が、リボソームのサイズ、投与量、および脂質組成の変化によって選択的に制御され得るということを示している。特に、本発明の方法を実施する場合、注射部位からの被包化合物の放出割合は、該部位に注射されたリボソームの平均サイズおよび合計量によって制御される。本発明のある局面では、平均サイズおよび脂質量は、より大きな空のリボソームを、興味ある化合物が被包されている、より小さな濃縮被包されたリボソームに添加することによって選択的に増加する。

本発明によれば、化合物を含有するリボソームまたは空の



リボソームのいずれか、あるいは両方にコレステロールを添加することによって、より長い放出時間も達成し得る。被包化合物をより早く放出させるためには、さらに負に荷電した脂質、例えばPGを脂質的に含むようにリボソームを処方し得る。

### 3. 治療での使用

本発明のリボソーム組成物は、様々なリボソーム不透透性化合物を非経口的に投与するために有用である。ある重要な応用は、ペプチドホルモンまたは免疫促進剤を、数日間をわたって制御された形で血中へ投与する際に用いることである。この組成物はペプチド放出の半減期を選択的に変化させることができ、数日までの選択された期間で放出させる。その時、ペプチドは、頻密にはなく、また遊離のペプチドの注射を用いた場合に見られるように急激に変動することなく与えられる。さらに、従来提案されてきたリボソーム調製物を用いるよりも、より度合の高い制御が達成され得る。

インシュリンおよびCTは、今日、遊離の形で経常的に投与されるペプチドの例である。これらのペプチドは両方とも、本発明のリボソーム組成物中に、容易に取り込まれ、該組成物の注射によって、数日間をわたって供給され得る。ホルモン供給の割合は、本発明の方法に従って、選択された平均のリボソームサイズ、量、および組成を用いることによって制御される。いくつかのペプチド、例えばCTに対して、リボ

ソーム組成物の付加された利点とは、安定性の増大が達成されることであり、これによりこの材料はかなり希釈された形で長期間にわたって保存される。

以下の実施例は、本発明の構造および利用に関する一定の実施態様を記述するものであって、本発明をいかなる模式にも制限することを意図するものではない。

(以下余白)

### 実施例 I

#### CT/HLVの問題

卵ホスファチジルコリン(EPC)および卵ホスファチジルグリセロールは、Avanti Lipid (バーミンガム、AL)によって供給された。これらの脂質は、薄層クロマトグラフィーによって約99%純粋であると判定された。コレステロール(CS)およびα-トコフェロール(α-T)は、それぞれReChab Prop. Inc. (イリジャン、NH)およびSigma Chemical Co. (セントルイス、MO)から入手したが、両者の純度は約99%またはそれ以上であった。サケカルシトニン(sCT)は、Armour Pharmaceuticals, カンカニー、ILから提供されたものであり、sCTはクロラミンT法(McFarland)によって<sup>125</sup>Iを用いて<sup>125</sup>I-放射線照射された。

表Iに示される脂質組成物A~Eの1つを含む多量ラメラ小胞(MLV)が調製された。4つの小胞調製物における脂質成分のモル比を表Iに示す。表中の値は、各種の小胞調製物を形成する際に用いられた各脂質成分のマイクロモル比を表す。筋肉内注射部位からのリボソーム脂質クリアランスの割合を測定する研究では、小胞形成脂質もホスファチジルエタノールアミンの放射性ヨウ素標識誘導体(<sup>125</sup>I-PB)トレーサーを含んでいた。このトレーサーを形成するために、卵ホスファチジルエタノールアミン(PBE)のp-ヒドロキシベンズアミドを、Abraによって述べられているように合成し、この化合物をGreenwoodによって述べられているように<sup>125</sup>Iでヨウ

素標識化した。貯蔵品の比放射能は、PB1ナノモルあたり3.85×10<sup>4</sup>cpsであった。ヨウ素標識脂質は、全脂質が0.2~10マイクロモルの範囲の注射に対して1×10<sup>5</sup>cpsで取り込まれた。

表 I

組成物	EPC	EPG	CS	α-T
A	99			1
B	94	5		1
C	49	5	40	1
D		99		1
E	59		40	1

HLVを形成するために、クロロホルム貯蔵液中の脂質組成物を試験管または丸底フラスコ中で混合した。クロロホルムをロータリーエバポレーターで除去し、この脂質混合物を1-ブタノールに溶解させた。次いで、ブタノール溶液をドライアイス/アセトンで凍結させ、1晩凍結乾燥させた。乾燥脂質を数mlのリン酸緩衝食塩水(PBS, pH7.4)で水和させた。CT/HLVを扱う研究では、水和用緩衝液は、0.2~5 mg/mlの<sup>125</sup>I-sCT、および sCTを含有した。

脂質膜は、室温で約15分間攪拌することにより水和され、約0.2~10ミクロンの範囲にわたる不均一なサイズを有するHLV懸濁液を形成した。小胞調製物は、選択された小孔サイズを有するポリカーボネート膜に通して押し出すことによってサイズを調整した。全調製物は、1.0ミクロンのポリカー

ポネート膜に連して押し出し、約1ミクロンの（殺菌剤の）初期小胞サイズを有する小胞を製造した。より小さなサイズの小胞を形成する際には、サイズを調整した小胞を、さらに0.4ミクロンと0.2ミクロンの小孔サイズの膜に連続して通して押し出し、初期に0.2ミクロンサイズの範囲内のサイズを有する小胞を製造した。

被包sCTを含むHLVは、PBSで3回洗浄することによって、非リボソーム関連の遊離のsCTが除去された。これらの調製物は、リムルスアノーバ分解産物分析（Boehringer, Inc., セントルイス, MO）によって発熱因子の試験が行われた。

#### 実施例II

##### リボソーム被包sCTの安定性

1.0mg/mlの被包sCTを含む組成物BHLVを実施例Iと同様に調製した。これらの小胞を1.0と0.4のポリカーボネートフィルターに連続して通して押し出し、PBS中で3回洗浄して遊離のsCTを取り除いた。これらのリボソームは希釈して終濃度を0.010mg/ml sCTとし、0.45mlの極性の緩衝液の膜面フィルターに通過させることによって滅菌し、そして無菌のNuncバイアルに分別した。0.5% BSAを含むPBS中に遊離のsCTを0.010mg/mlまたは1.0mg/mlのいずれかで含む緩衝液もバイアルに分別した。リボソームに被包されたsCT調製物および遊離のsCT調製物は、表IIでは、それぞれL-sCTおよびF-sCTと表されている。

表 II

№	試料	(sCT) (mg/ml)	濃度 (%)	時間 (日)	活性 (%)
1	F-sCT	0.01	4	128	27
2	F-sCT	1.0	4	128	100
3	L-sCT	0.01	4	128	100
4	L-sCT	0.01	4	215	100
5	F-sCT	0.01	87	43	40
6	F-sCT	1.0	87	43	100
7	L-sCT	0.01	87	43	100
8	F-sCT	1.0	87	98	61
9	L-sCT	0.01	87	98	62
10	F-sCT	1.0	37	7	62
11	L-sCT	0.01	37	7	74

最初の3行は、F-sCTの希釈液と濃縮液およびL-sCTの希釈液の4つにおける128日間の安定性を比較したものである。明らかに、希釈F-sCTは、この期間にその活性の大部分を失うが、L-sCTは失わない。リボソーム安定化効果は、おそらくリボソームの被包空間内における局所的に高濃度のsCT(約1mg/ml)によるものである。第4行からわかるように、希釈液中の被包sCTは少なくとも215日間安定である。

同様のリボソーム保護効果は、室温でインキュベートされたsCTに見られる。43日のインキュベーション期間で、F-sCTの希釈液は、その活性の約60%を失ったが、濃縮F-sCT調製物および希釈L-sCT調製物は失活を示さなかった。後者の2つの調製物が大体同じ安定性を有することは、室温で98日間インキュベートしたデータ、および37℃で7日間インキュベートしたデータから明らかである。

F-sCT調製物およびL-sCT調製物の安定性は、上記バイアルを4℃、室温(約24℃)、および37℃のいずれかでインキュベートし、そして所定期間インキュベートした後にsCT生物活性を分した後、試験した。試料は、Sigma(セントルイス, MO)から入手した0.5%トリトン-X中で溶解させ、0.5%BSAを含むPBS1mlあたり40uおよび120uに希釈した。凍結した標準F-sCTのアリコットを同様に処理した。

各試料は8匹のラットで試験したが、4匹のラットには10uのsCT(0.25mlの40u/ml希釈液)を、4匹のラットには30u(0.25mlの120u/ml希釈液)を皮下投与した。対照ラットには、0.25mlのPBS/BSAを投与した。注射して正確に60分後、血液試料を各ラットから採取した。これらの血液試料は、凝固させて血清試料を遠心分離によって採集した。血清中のカルシウムレベルはSigma Chemical Co. (セントルイス, MO)によって供給されたキットを用いて、色素結合分析により測定した。これらの試料の低カルシウム活性は、注射の60分後に、標準曲線から決定した。結果は、各データ値に対する4匹のラットの平均値として表され、表IIに与えられている。

(以下空白)

#### 実施例III

##### 18注射部位からの脂質クリアランス

ここで報告される研究は、実験室ラットにおける筋肉内(18)注射部位からのリボソーム脂質クリアランスの割合を調べたものであり、該クリアランスの割合は放射性脂質トレーサーによって測定した。実施例Iの脂質組成物A-Dの1つを有するHLVを、0.2、2、または10マイクロモル脂質の選択された投与量で動物に注射した。

重量95~110gの雄SDラットを軽度エーテルで麻酔し、0.2マイクロモルの脂質を含む20μlを前肢に注射するか、あるいは2~10マイクロモルの脂質を含む100μlを各ラットの後肢に注射した。18匹のラットを各実験に用いた。ラットのうち2匹を代謝ケージに入れ、尿および糞便中への放射能の排泄をモニターした。試験期間が70時間から6日間にわたる各実験について、8つの時点を設定した。この8つの時点は、典型的な実験に対する第1図および第2図に明らかであるが、18部位からの脂質クリアランスの半減期が、注射後の時間に対する残留放射能の片対数プロットによって決定し得るように選択した(第2図)。各時点では、2匹のラットを血液採取のために麻酔した。2mlの血液を採取し、<sup>14</sup>Cの放射能を計数した。次いで、これらのラットはCO<sub>2</sub>チューンバー中で窒息死させ、注射した肢を解剖して放射能を計数した。尿と糞便は、実験の間に代謝ケージ中の2匹の動物から採集した。これらの2匹の動物も殺したが、これが最後の時

点となる。そしてまた、計数するために甲状腺、肺、心臓、肝臓、脾臓、胃、腸、および生殖系を解剖した。残った胴体は、計数前に分解した。放射能レベルを測定し、実験期間の終わりにおける、これらの動物中の残留脂肪トレーサの配置を決定した。

典型的な実験の結果を第2図に示す。上方の曲線(丸印)は、注射部位(腹部)において保持された放射能を示し、投与された初期脂肪投与量の百分率で表されている。誤差の棒線は、各時点における2匹の動物間の幅を表す。明らかなように、注射部位からのクリアランスの半減期は、約40~50時間の間にあり、(次節で考察される)第3図に示すようにデータを片対数プロットすることによって決定される。

尿および糞便中に測定された累積放射能レベルは、図中の黒い三角形で表される。この実験における70時間の試験期間の終わりでの全排泄放射能は、投与された初期投与量の約72%である。残りの計数は、肝臓(約5%)、胴体(約20%)、および腸管(約3%)に分布している。腸管に局在している、約3%の残りの放射能のうち、約55%は腸に、約34%は肝臓に、そして脾臓、尿管、腎臓、胃、心臓、肺、および生殖系の各々には約5%より少なく見出される。

#### 実施例IV

1H注射部位からの脂肪クリアランスに対する  
リボソームサイズ、投与量、およびリボソーム組成の効果

不一致は、おそらくリボソームの濃度を反映するものであり、リボソーム濃度が高い場合、主として組成物AおよびBのHLVにおいてのみ生じる傾向がある。これらのHLVは負に帯電した脂肪(PG)を含んでいない。

ラットに投与される投与量は、注射ごとに20μgまたは100μgあたりのマイクロモル脂肪によって測定された。表中の投与量の欄に示した値は、注射ごとの全投与量である。

#### 表 II

№	組成物	サイズ(μm) 押出値	測定値	注射ごとの投与量 (μg/μl)	1-1/2 (日)
1	A	1.0	3.2	0.2/20	48.7
2	A	1.0	3.2	2/100	57.6
3	A	1.0	5.4	10/100	110.7
4	B	0.2	0.23	0.2/20	17.8
5	B	1.0	1.3	0.2/20	33.3
6	B	1.0	1.0	10/100	62.2
7	C	0.2	0.25	0.2/20	15.3
8	C	1.0	1.1	0.2/20	26.8
9	C	1.0	1.0	10/100	69.4
10	D	1.0	0.9	10/100	17.7

第1列~第3列のデータは、1H部位からの脂肪クリアランスに対する全脂肪投与量の効果を表す。明らかなように、注射された脂肪量が約0.2マイクロモルから10マイクロモルに増加すると、クリアランスの半減期が約2倍増大する。同じ効果は、組成物BのHLV(第5列と第6列)および組成物CのHLV(第8列と第9列)に見られる。

半減期のデータは、脂肪クリアランスの割合が大きなりボ

1Hリボソーム注射部位におけるトレーサ脂肪の保持は、該部位からのトレーサクリアランスの半減期によって測定されるが、リボソームサイズ、組成、および脂肪投与量の関数として調べた。クリアランスの半減期は、実施例Iで述べたように、雄ラットの注射された肢における放射能減少を、少なくとも70時間の期間にわたって追跡することによって計算した。各実験から、第2図の黒丸の曲線のような曲線が得られた。この曲線は、時間と共に注射部位の放射能が減少することを示している。

第3図の上方の点線は、時間の関数として片対数プロットで表された同じデータを示す。このプロットから、注射部位からの脂肪クリアランス半減期は、容易に決定され得る。特定の実施例では、半減期(この時点では、脂肪が50%保持されている)は48時間である。半減期のデータは、各実験に対する片対数プロットの傾きから決定され以下の表に示す。

リボソームサイズは、表IIに示すが、これらのサイズは、HLVをサイズ調整する際に用いたポリカーボネート膜の小孔サイズ、および実際のHLVの平均サイズによって表されている。HLVの平均サイズは、Elcospの粒径分析器(モデル200)によって測定し、標準化されたラテックスビーズで校正した。このようにして、例えば第1行目の注射されたHLVは、1ミクロンのポリカーボネート膜に通して押し出すことによって調整されたが、その測定された平均の粒子サイズは約3.2ミクロンを示した。押し出されたサイズと測定されたサイズの

ソームサイズによって著しく増加することも示している。この効果は、第4列と第5列、および第7列と第8列から明らかである。これらの両者は、それぞれ0.2ミクロンと1.0ミクロンのフィルターを通して押し出されたHLVのクリアランス割合を比較したものである。大きなリボソームは、クリアランス半減期を約60~100%だけ増加させた。組成物AのHLVに観察された比較的大きいクリアランス割合は、少なくとも部分的には、レーザー粒径分析によって測定される。これらのHLVのサイズが比較的大きいことを反映し得る。第2図に片対数プロットを示す。この図から、第1列の半減期(点線)および第4列の半減期(実線)が計算された。

第1列を第4列および第7列(投与量レベルの0.2/20)、そして第3列を第6列および第9列(投与量レベル10/100)と比較すると、クリアランス割合に対する負に帯電したリン脂質(PG)の顕著な効果が示されるが、コレステロールの存在による効果はほとんどない。上で示唆したように、PGの効果は、少なくとも部分的には、PG含有リボソームで観察された小さなサイズによるものであり得る。しかしながら、EPG HLVに対して測定された半減期(第10列)は、5モル%または10モル%PGのいずれかを含有するHLV(それぞれ、第6列または第9列)と比較すると、リボソームサイズに関係するようには見えないPG濃度の強い効果を示している。

## 実施例V

IH注射部位からの<sup>125</sup>I-CTクリアランスに対する

## リボソームサイズ、投与量、およびリボソーム組成物の効果

筋肉内(IH)注射部位からのリボソームに被包された<sup>125</sup>I-CTのクリアランス割合は、実施例IIで述べた手順と同様の手順により、注射部位における<sup>125</sup>I-CTの量を測定することによって決定された。実施例Iで述べた脂質組成物A、B、DおよびEの1つを有するHLVを、0.2、2または10マイクロモル脂質の選択された投与量で動物に注射した。これらのHLVには、約0.5  $\mu$ gの<sup>125</sup>I-CTが被包されており、<sup>125</sup>I-CTの比放射能は約 $1 \times 10^5$  cps/0.5  $\mu$ gであった。運動の<sup>125</sup>I-CTは、リボソーム懸濁液から遠心分離によって取り除いた。注射後、70時間～8日間の試験期間にわたる間隔のある時点で一対の動物を殺し、これらの動物の注射された肢、および肢多くの器官における放射性<sup>125</sup>I-CTの保持を、上の実施例IIで述べたように測定した。注射された動物のうち2匹は、試験期間中の尿および糞便による<sup>125</sup>I-CTの排泄をモニターした。

典型的な実験の結果を第4図に示す。上方の曲線(丸印)は、注射部位における<sup>125</sup>I-CTの保持を表し、中間の曲線(三角印)は、試験期間中に動物によって排泄された累積放射能を表す。明らかに、初期に注射された<sup>125</sup>I-CTの約70～80%は、この実験の70時間後に排泄される。血流への<sup>125</sup>I-CTの脂質クリアランスは、下方の曲線(四角印)によって示される。

組成物の顕著な効果も表している。HLV中(組成物BおよびD)にPGが存在すると、トレーサー脂質に対して見出されたことと同様に、投与量が等しい2つのPG非含有HLV(組成物AおよびE)よりもクリアランス割合が非常に小さくなった。また、PG非含有脂質にコレステロールを添加すると、<sup>125</sup>I-CTのクリアランス割合が著しく増加した。これは、第2列と第6列、および第3列と第7列を比較すると明らかである。ここで、第2列と第6列は投与量2/100に関し、第3列と第7列は投与量10/100に関する。

IH投与された脂質と50投与された脂質のクリアランス半減期が同程度であるということに注目しなければならない。例えば、クリアランスのIH半減期が20.8時間および9.7時間である脂質の50半減期は、それぞれ19.4時間および8.3時間である。

以下の表Vは、脂質トレーサーに関して、表IVの<sup>125</sup>I-CTクリアランス割合の少しと、表IIの対応する割合を比較したものである。興味あることに、すべての脂質組成物、および比較データを利用し得る投与量に対して、<sup>125</sup>I-CT割合は脂質トレーサーの約半分である。この発見は、リボソームが不安定化され、その被包成分を主に注射部位で放出し、そして注射部位からの脂質クリアランスが、異なる、より緩慢な機構によって取り扱われることを示唆している。

(以下省略)

<sup>125</sup>I-CT保持 データを第5図に示すように片対数形式でプロットすると、結果は直線プロットになる。このプロットから、クリアランス半減期が決定され得る。図に示した例では、半減期は約8時間である。調べた4つの脂質組成物および2つの脂質投与量に対して、このように測定された半減期データは、以下 表IVに与えられている。すべての研究において、HLVは、あらかじめ1.0の小孔ポリカーボネート膜に通して押し出すことによってサイズが調整されているが、さらに小孔が小さい膜に通して押し出されなかった。

No.	組成物	表 IV	
		投与量 ( $\mu$ moles/vol)	T-1/2
1	A	0.2/20	21.3
2	A	2/100	25.9
3	A	10/100	55.4
4	B	0.2/20	11.7
5	D	10/100	8.4
6	E	2/100	47.7
7	E	10/100	65.8

第1列～第3列のデータ、および第6列～第7列のデータは、IH部位からの<sup>125</sup>I-CTクリアランスに対する全脂質投与量の効果を示している。トレーサー脂質のクリアランスに対して観察されたことと同様に、0.2～10マイクロモル脂質の範囲にわたって全脂質投与量が増加すると、<sup>125</sup>I-CTのクリアランス半減期が2～3倍増加した。

これらのデータは、<sup>125</sup>I-CTのクリアランス割合に対する脂質

組成物	投与量 ( $\mu$ moles/vol)	表 V	
		クリアランス <sup>125</sup> I-CT	脂質
A	0.2/20	21.3	48.7
A	2/100	20.8	57.6
A	10/100	55.4	110.7
B	0.2/20	11.7	33.3
D	10/100	8.4	17.7

## 実施例VI

小さなHLVからの<sup>125</sup>I-CT放出に対して添加された空のリボソーム

BPC:  $\alpha$ -Tを99:1で、かつ被包された<sup>125</sup>I-CTを含む逆相発小胞(REV)を標準的なREV手順(Szoka)に従って調製した。これらの小胞は、0.4  $\mu$ mおよび0.2  $\mu$ mのポリカーボネートフィルターに通して押し出し、被包されていない<sup>125</sup>I-CTは、遠心分離を行い、PBS中で3回洗浄することによって小胞懸濁液から取り除いた。次いで、調製物は0.22ミクロンの逆相フィルターに通して濃縮した。

同一組成の空のHLVを調製し、実施例Iで述べたように無菌条件下で1  $\mu$ mのフィルターに通して押し出した。REVを1:50のモル比でHLVと混合し、各IH注射が10マイクロモルの全脂質中に約 $1 \times 10^5$  cpsの<sup>125</sup>I-CTと約0.5  $\mu$ gの<sup>125</sup>I-CTを含むようにした。リボソームの混合物は注射前に1晩放置して平衡させた。実施例IIで述べられたように、リボソーム混合物またはREVをラットに皮下注射した。注射部位からの<sup>125</sup>I-CT放射能のクリアランスは、実施例IIで述べたように、

片対数プロットによって決定した。REVのみの場合、およびREVに空のHLVを加えた場合、半減期データを表VIに示す。

表 VI

組成物	リボソームの種類	投与量 ( $\mu\text{mol}/100\text{g}$ )	半減期
A	REV	0.2	7.2
A	REV+HLV	10.0	41.9
A	HLV	10.0	55.4

明らかなように、空のHLVを0.2ミクロンのREVに添加すると、REVからのCTクリアランスの半減期が5倍より大きく増加した。表中の第3列は、HLVのみからのCT放出に対するCTクリアランスの半減期を与える(実施例IVのように)。第2列および第3列を比較すると、ペプチド含有リボソームのサイズは、空のリボソームのサイズおよびまたは量と共に、この部位からのペプチド放出割合に影響を与えることが示される。

本発明の好ましい実施態様は、ここに述べられているが、本発明から逸脱することなく、様々な変化および変更を行い得ることは明白である。特に、本発明の一般原理を例証するためにCTのリボソーム供給が用いられているが、他のリボソーム不透過性化合物についても同様の放出特性が観察されることは当業者に明らかである。

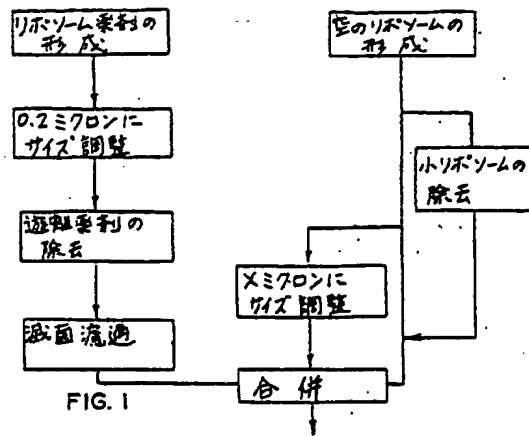
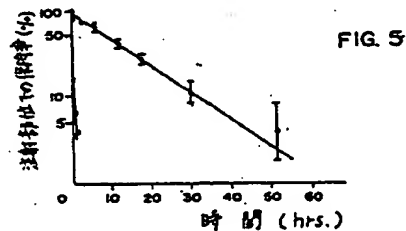
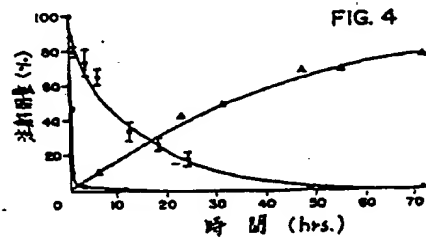
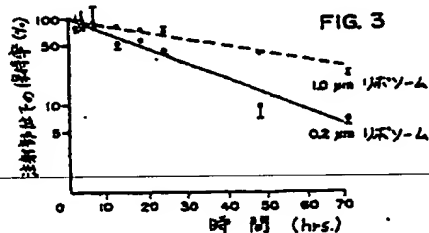
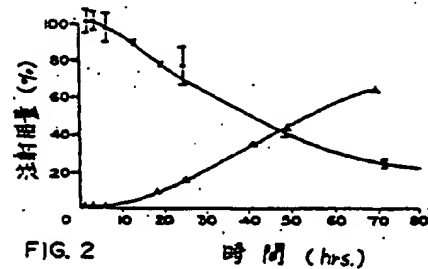


FIG. 1



特許調査報告書

Classification of Subject Matter in accordance with the International Patent Classification (IPC) Class: PC7/US27/00181

INT. CL. 4: A61K 35/12, 35/14, 35/16, 35/18, 35/20, 35/22, 35/24, 35/26, 35/28, 35/30, 35/32, 35/34, 35/36, 35/38, 35/40, 35/42, 35/44, 35/46, 35/48, 35/50, 35/52, 35/54, 35/56, 35/58, 35/60, 35/62, 35/64, 35/66, 35/68, 35/70, 35/72, 35/74, 35/76, 35/78, 35/80, 35/82, 35/84, 35/86, 35/88, 35/90, 35/92, 35/94, 35/96, 35/98, 35/100; A61M 31/00; See Attachment U.S. CL. 1: 424/417, 424/418, 424/419, 424/420, 424/421, 424/422, 424/423, 424/424, 424/425, 424/426, 424/427, 424/428, 424/429, 424/430, 424/431, 424/432, 424/433, 424/434, 424/435, 424/436, 424/437, 424/438, 424/439, 424/440, 424/441, 424/442, 424/443, 424/444, 424/445, 424/446, 424/447, 424/448, 424/449, 424/450, 424/451, 424/452, 424/453, 424/454, 424/455, 424/456, 424/457, 424/458, 424/459, 424/460, 424/461, 424/462, 424/463, 424/464, 424/465, 424/466, 424/467, 424/468, 424/469, 424/470, 424/471, 424/472, 424/473, 424/474, 424/475, 424/476, 424/477, 424/478, 424/479, 424/480, 424/481, 424/482, 424/483, 424/484, 424/485, 424/486, 424/487, 424/488, 424/489, 424/490, 424/491, 424/492, 424/493, 424/494, 424/495, 424/496, 424/497, 424/498, 424/499, 424/500; A61P 31/00; A61P 35/00; A61P 37/00; A61P 39/00; A61P 41/00; A61P 43/00; A61P 45/00; A61P 47/00; A61P 49/00; A61P 51/00; A61P 53/00; A61P 55/00; A61P 57/00; A61P 59/00; A61P 61/00; A61P 63/00; A61P 65/00; A61P 67/00; A61P 69/00; A61P 71/00; A61P 73/00; A61P 75/00; A61P 77/00; A61P 79/00; A61P 81/00; A61P 83/00; A61P 85/00; A61P 87/00; A61P 89/00; A61P 91/00; A61P 93/00; A61P 95/00; A61P 97/00; A61P 99/00; A61P 101/00; A61P 103/00; A61P 105/00; A61P 107/00; A61P 109/00; A61P 111/00; A61P 113/00; A61P 115/00; A61P 117/00; A61P 119/00; A61P 121/00; A61P 123/00; A61P 125/00; A61P 127/00; A61P 129/00; A61P 131/00; A61P 133/00; A61P 135/00; A61P 137/00; A61P 139/00; A61P 141/00; A61P 143/00; A61P 145/00; A61P 147/00; A61P 149/00; A61P 151/00; A61P 153/00; A61P 155/00; A61P 157/00; A61P 159/00; A61P 161/00; A61P 163/00; A61P 165/00; A61P 167/00; A61P 169/00; A61P 171/00; A61P 173/00; A61P 175/00; A61P 177/00; A61P 179/00; A61P 181/00; A61P 183/00; A61P 185/00; A61P 187/00; A61P 189/00; A61P 191/00; A61P 193/00; A61P 195/00; A61P 197/00; A61P 199/00; A61P 201/00; A61P 203/00; A61P 205/00; A61P 207/00; A61P 209/00; A61P 211/00; A61P 213/00; A61P 215/00; A61P 217/00; A61P 219/00; A61P 221/00; A61P 223/00; A61P 225/00; A61P 227/00; A61P 229/00; A61P 231/00; A61P 233/00; A61P 235/00; A61P 237/00; A61P 239/00; A61P 241/00; A61P 243/00; A61P 245/00; A61P 247/00; A61P 249/00; A61P 251/00; A61P 253/00; A61P 255/00; A61P 257/00; A61P 259/00; A61P 261/00; A61P 263/00; A61P 265/00; A61P 267/00; A61P 269/00; A61P 271/00; A61P 273/00; A61P 275/00; A61P 277/00; A61P 279/00; A61P 281/00; A61P 283/00; A61P 285/00; A61P 287/00; A61P 289/00; A61P 291/00; A61P 293/00; A61P 295/00; A61P 297/00; A61P 299/00; A61P 301/00; A61P 303/00; A61P 305/00; A61P 307/00; A61P 309/00; A61P 311/00; A61P 313/00; A61P 315/00; A61P 317/00; A61P 319/00; A61P 321/00; A61P 323/00; A61P 325/00; A61P 327/00; A61P 329/00; A61P 331/00; A61P 333/00; A61P 335/00; A61P 337/00; A61P 339/00; A61P 341/00; A61P 343/00; A61P 345/00; A61P 347/00; A61P 349/00; A61P 351/00; A61P 353/00; A61P 355/00; A61P 357/00; A61P 359/00; A61P 361/00; A61P 363/00; A61P 365/00; A61P 367/00; A61P 369/00; A61P 371/00; A61P 373/00; A61P 375/00; A61P 377/00; A61P 379/00; A61P 381/00; A61P 383/00; A61P 385/00; A61P 387/00; A61P 389/00; A61P 391/00; A61P 393/00; A61P 395/00; A61P 397/00; A61P 399/00; A61P 401/00; A61P 403/00; A61P 405/00; A61P 407/00; A61P 409/00; A61P 411/00; A61P 413/00; A61P 415/00; A61P 417/00; A61P 419/00; A61P 421/00; A61P 423/00; A61P 425/00; A61P 427/00; A61P 429/00; A61P 431/00; A61P 433/00; A61P 435/00; A61P 437/00; A61P 439/00; A61P 441/00; A61P 443/00; A61P 445/00; A61P 447/00; A61P 449/00; A61P 451/00; A61P 453/00; A61P 455/00; A61P 457/00; A61P 459/00; A61P 461/00; A61P 463/00; A61P 465/00; A61P 467/00; A61P 469/00; A61P 471/00; A61P 473/00; A61P 475/00; A61P 477/00; A61P 479/00; A61P 481/00; A61P 483/00; A61P 485/00; A61P 487/00; A61P 489/00; A61P 491/00; A61P 493/00; A61P 495/00; A61P 497/00; A61P 499/00; A61P 501/00; A61P 503/00; A61P 505/00; A61P 507/00; A61P 509/00; A61P 511/00; A61P 513/00; A61P 515/00; A61P 517/00; A61P 519/00; A61P 521/00; A61P 523/00; A61P 525/00; A61P 527/00; A61P 529/00; A61P 531/00; A61P 533/00; A61P 535/00; A61P 537/00; A61P 539/00; A61P 541/00; A61P 543/00; A61P 545/00; A61P 547/00; A61P 549/00; A61P 551/00; A61P 553/00; A61P 555/00; A61P 557/00; A61P 559/00; A61P 561/00; A61P 563/00; A61P 565/00; A61P 567/00; A61P 569/00; A61P 571/00; A61P 573/00; A61P 575/00; A61P 577/00; A61P 579/00; A61P 581/00; A61P 583/00; A61P 585/00; A61P 587/00; A61P 589/00; A61P 591/00; A61P 593/00; A61P 595/00; A61P 597/00; A61P 599/00; A61P 601/00; A61P 603/00; A61P 605/00; A61P 607/00; A61P 609/00; A61P 611/00; A61P 613/00; A61P 615/00; A61P 617/00; A61P 619/00; A61P 621/00; A61P 623/00; A61P 625/00; A61P 627/00; A61P 629/00; A61P 631/00; A61P 633/00; A61P 635/00; A61P 637/00; A61P 639/00; A61P 641/00; A61P 643/00; A61P 645/00; A61P 647/00; A61P 649/00; A61P 651/00; A61P 653/00; A61P 655/00; A61P 657/00; A61P 659/00; A61P 661/00; A61P 663/00; A61P 665/00; A61P 667/00; A61P 669/00; A61P 671/00; A61P 673/00; A61P 675/00; A61P 677/00; A61P 679/00; A61P 681/00; A61P 683/00; A61P 685/00; A61P 687/00; A61P 689/00; A61P 691/00; A61P 693/00; A61P 695/00; A61P 697/00; A61P 699/00; A61P 701/00; A61P 703/00; A61P 705/00; A61P 707/00; A61P 709/00; A61P 711/00; A61P 713/00; A61P 715/00; A61P 717/00; A61P 719/00; A61P 721/00; A61P 723/00; A61P 725/00; A61P 727/00; A61P 729/00; A61P 731/00; A61P 733/00; A61P 735/00; A61P 737/00; A61P 739/00; A61P 741/00; A61P 743/00; A61P 745/00; A61P 747/00; A61P 749/00; A61P 751/00; A61P 753/00; A61P 755/00; A61P 757/00; A61P 759/00; A61P 761/00; A61P 763/00; A61P 765/00; A61P 767/00; A61P 769/00; A61P 771/00; A61P 773/00; A61P 775/00; A61P 777/00; A61P 779/00; A61P 781/00; A61P 783/00; A61P 785/00; A61P 787/00; A61P 789/00; A61P 791/00; A61P 793/00; A61P 795/00; A61P 797/00; A61P 799/00; A61P 801/00; A61P 803/00; A61P 805/00; A61P 807/00; A61P 809/00; A61P 811/00; A61P 813/00; A61P 815/00; A61P 817/00; A61P 819/00; A61P 821/00; A61P 823/00; A61P 825/00; A61P 827/00; A61P 829/00; A61P 831/00; A61P 833/00; A61P 835/00; A61P 837/00; A61P 839/00; A61P 841/00; A61P 843/00; A61P 845/00; A61P 847/00; A61P 849/00; A61P 851/00; A61P 853/00; A61P 855/00; A61P 857/00; A61P 859/00; A61P 861/00; A61P 863/00; A61P 865/00; A61P 867/00; A61P 869/00; A61P 871/00; A61P 873/00; A61P 875/00; A61P 877/00; A61P 879/00; A61P 881/00; A61P 883/00; A61P 885/00; A61P 887/00; A61P 889/00; A61P 891/00; A61P 893/00; A61P 895/00; A61P 897/00; A61P 899/00; A61P 901/00; A61P 903/00; A61P 905/00; A61P 907/00; A61P 909/00; A61P 911/00; A61P 913/00; A61P 915/00; A61P 917/00; A61P 919/00; A61P 921/00; A61P 923/00; A61P 925/00; A61P 927/00; A61P 929/00; A61P 931/00; A61P 933/00; A61P 935/00; A61P 937/00; A61P 939/00; A61P 941/00; A61P 943/00; A61P 945/00; A61P 947/00; A61P 949/00; A61P 951/00; A61P 953/00; A61P 955/00; A61P 957/00; A61P 959/00; A61P 961/00; A61P 963/00; A61P 965/00; A61P 967/00; A61P 969/00; A61P 971/00; A61P 973/00; A61P 975/00; A61P 977/00; A61P 979/00; A61P 981/00; A61P 983/00; A61P 985/00; A61P 987/00; A61P 989/00; A61P 991/00; A61P 993/00; A61P 995/00; A61P 997/00; A61P 999/00; A61P 1001/00; A61P 1003/00; A61P 1005/00; A61P 1007/00; A61P 1009/00; A61P 1011/00; A61P 1013/00; A61P 1015/00; A61P 1017/00; A61P 1019/00; A61P 1021/00; A61P 1023/00; A61P 1025/00; A61P 1027/00; A61P 1029/00; A61P 1031/00; A61P 1033/00; A61P 1035/00; A61P 1037/00; A61P 1039/00; A61P 1041/00; A61P 1043/00; A61P 1045/00; A61P 1047/00; A61P 1049/00; A61P 1051/00; A61P 1053/00; A61P 1055/00; A61P 1057/00; A61P 1059/00; A61P 1061/00; A61P 1063/00; A61P 1065/00; A61P 1067/00; A61P 1069/00; A61P 1071/00; A61P 1073/00; A61P 1075/00; A61P 1077/00; A61P 1079/00; A61P 1081/00; A61P 1083/00; A61P 1085/00; A61P 1087/00; A61P 1089/00; A61P 1091/00; A61P 1093/00; A61P 1095/00; A61P 1097/00; A61P 1099/00; A61P 1101/00; A61P 1103/00; A61P 1105/00; A61P 1107/00; A61P 1109/00; A61P 1111/00; A61P 1113/00; A61P 1115/00; A61P 1117/00; A61P 1119/00; A61P 1121/00; A61P 1123/00; A61P 1125/00; A61P 1127/00; A61P 1129/00; A61P 1131/00; A61P 1133/00; A61P 1135/00; A61P 1137/00; A61P 1139/00; A61P 1141/00; A61P 1143/00; A61P 1145/00; A61P 1147/00; A61P 1149/00; A61P 1151/00; A61P 1153/00; A61P 1155/00; A61P 1157/00; A61P 1159/00; A61P 1161/00; A61P 1163/00; A61P 1165/00; A61P 1167/00; A61P 1169/00; A61P 1171/00; A61P 1173/00; A61P 1175/00; A61P 1177/00; A61P 1179/00; A61P 1181/00; A61P 1183/00; A61P 1185/00; A61P 1187/00; A61P 1189/00; A61P 1191/00; A61P 1193/00; A61P 1195/00; A61P 1197/00; A61P 1199/00; A61P 1201/00; A61P 1203/00; A61P 1205/00; A61P 1207/00; A61P 1209/00; A61P 1211/00; A61P 1213/00; A61P 1215/00; A61P 1217/00; A61P 1219/00; A61P 1221/00; A61P 1223/00; A61P 1225/00; A61P 1227/00; A61P 1229/00; A61P 1231/00; A61P 1233/00; A61P 1235/00; A61P 1237/00; A61P 1239/00; A61P 1241/00; A61P 1243/00; A61P 1245/00; A61P 1247/00; A61P 1249/00; A61P 1251/00; A61P 1253/00; A61P 1255/00; A61P 1257/00; A61P 1259/00; A61P 1261/00; A61P 1263/00; A61P 1265/00; A61P 1267/00; A61P 1269/00; A61P 1271/00; A61P 1273/00; A61P 1275/00; A61P 1277/00; A61P 1279/00; A61P 1281/00; A61P 1283/00; A61P 1285/00; A61P 1287/00; A61P 1289/00; A61P 1291/00; A61P 1293/00; A61P 1295/00; A61P 1297/00; A61P 1299/00; A61P 1301/00; A61P 1303/00; A61P 1305/00; A61P 1307/00; A61P 1309/00; A61P 1311/00; A61P 1313/00; A61P 1315/00; A61P 1317/00; A61P 1319/00; A61P 1321/00; A61P 1323/00; A61P 1325/00; A61P 1327/00; A61P 1329/00; A61P 1331/00; A61P 1333/00; A61P 1335/00; A61P 1337/00; A61P 1339/00; A61P 1341/00; A61P 1343/00; A61P 1345/00; A61P 1347/00; A61P 1349/00; A61P 1351/00; A61P 1353/00; A61P 1355/00; A61P 1357/00; A61P 1359/00; A61P 1361/00; A61P 1363/00; A61P 1365/00; A61P 1367/00; A61P 1369/00; A61P 1371/00; A61P 1373/00; A61P 1375/00; A61P 1377/00; A61P 1379/00; A61P 1381/00; A61P 1383/00; A61P 1385/00; A61P 1387/00; A61P 1389/00; A61P 1391/00; A61P 1393/00; A61P 1395/00; A61P 1397/00; A61P 1399/00; A61P 1401/00; A61P 1403/00; A61P 1405/00; A61P 1407/00; A61P 1409/00; A61P 1411/00; A61P 1413/00; A61P 1415/00; A61P 1417/00; A61P 1419/00; A61P 1421/00; A61P 1423/00; A61P 1425/00; A61P 1427/00; A61P 1429/00; A61P 1431/00; A61P 1433/00; A61P 1435/00; A61P 1437/00; A61P 1439/00; A61P 1441/00; A61P 1443/00; A61P 1445/00; A61P 1447/00; A61P 1449/00; A61P 1451/00; A61P 1453/00; A61P 1455/00; A61P 1457/00; A61P 1459/00; A61P 1461/00; A61P 1463/00; A61P 1465/00; A61P 1467/00; A61P 1469/00; A61P 1471/00; A61P 1473/00; A61P 1475/00; A61P 1477/00; A61P 1479/00; A61P 1481/00; A61P 1483/00; A61P 1485/00; A61P 1487/00; A61P 1489/00; A61P 1491/00; A61P 1493/00; A61P 1495/00; A61P 1497/00; A61P 1499/00; A61P 1501/00; A61P 1503/00; A61P 1505/00; A61P 1507/00; A61P 1509/00; A61P 1511/00; A61P 1513/00; A61P 1515/00; A61P 1517/00; A61P 1519/00; A61P 1521/00; A61P 1523/00; A61P 1525/00; A61P 1527/00; A61P 1529/00; A61P 1531/00; A61P 1533/00; A61P 1535/00; A61P 1537/00; A61P 1539/00; A61P 1541/00; A61P 1543/00; A61P 1545/00; A61P 1547/00; A61P 1549/00; A61P 1551/00; A61P 1553/00; A61P 1555/00; A61P 1557/00; A61P 1559/00; A61P 1561/00; A61P 1563/00; A61P 1565/00; A61P 1567/00; A61P 1569/00; A61P 1571/00; A61P 1573/00; A61P 1575/00; A61P 1577/00; A61P 1579/00; A61P 1581/00; A61P 1583/00; A61P 1585/00; A61P 1587/00; A61P 1589/00; A61P 1591/00; A61P 1593/00; A61P 1595/00; A61P 1597/00; A61P 1599/00; A61P 1601/00; A61P 1603/00; A61P 1605/00; A61P 1607/00; A61P 1609/00; A61P 1611/00; A61P 1613/00; A61P 1615/00; A61P 1617/00; A61P 1619/00; A61P 1621/00; A61P 1623/00; A61P 1625/00; A61P 1627/00; A61P 1629/00; A61P 1631/00; A61P 1633/00; A61P 1635/00; A61P 1637/00; A61P 1639/00; A61P 1641/00; A61P 1643/00; A61P 1645/00; A61P 1647/00; A61P 1649/00; A61P 1651/00; A61P 1653/00; A61P 1655/00; A61P 1657/00; A61P 1659/00; A61P 1661/00; A61P 1663/00; A

Attachment to Form PCT/ISA/119, Part I.

INT. CL<sup>4</sup>: 201J 13/02; B32B 5/16, 9/02, 9/04

Document Reference No. PCT/US87/00285

FOREIGN INFORMATION SOURCES FROM THE SECOND ENTRY 7 Chemical Abstracts, Volume 99, No. 7, issued 15 August 1983 (Columbus, Ohio, USA); Kang et al., "Decreasing the tumor uptake of liposomally entrapped substances by prior injection of empty liposomes", see page 305, column 1, the Abstract No. 580040, INCS Med. Sci., Libr. Compand. 1983, 11(9), 420-1 (Eng).		All
<input checked="" type="checkbox"/> INFORMATION SOURCES WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNREMARKABLE TO This International Search Report has not been prepared in respect of certain claims under Article 17B(2) of the following convention: <input type="checkbox"/> Code Number: . . . . . because they relate to subject matter not considered to be patentable, namely:		
<input type="checkbox"/> Other reason: . . . . . because they relate to items of the International Classification that do not comply with the procedural requirements in force at the time that the International Search Report was prepared, namely:		
<input checked="" type="checkbox"/> INFORMATION SOURCES WHERE ENTRY OF INVENTION IS LACKING TO This International Searching Authority found enough evidence in the International application to believe:		
<input type="checkbox"/> An abstracted additional search has been made and by the evidence, the International Search Report shows all necessary claims of the International application.		
<input type="checkbox"/> An entry search of the International additional search has been made and by the evidence, the International Search Report shows only those claims of the International application for which there was prior art, specifically claiming:		
<input type="checkbox"/> An abstracted additional search has been made and by the evidence, the International Search Report shows all necessary claims of the International application for which there was prior art, specifically claiming:		
<input type="checkbox"/> An abstracted additional search has been made and by the evidence, the International Searching Authority and the Applicant agree that:		
<input type="checkbox"/> The International Search Report was prepared in accordance with the evidence.		
<input type="checkbox"/> The evidence substantiated the evidence of International Search Report.		

Form PCT/ISA/119 (Supplemental sheet 10) (July 1986)